

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Григорян Лилит Норайровны «БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ», представленную на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальностям

1.5.11. – Микробиология; 1.5.6. – Биотехнология

Диссертационная работа Григорян Лилит Норайровны на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящена поиску и выделению из природных источников новых штаммов актиномицетов, потенциально пригодных в качестве основы для создания новых эффективных и экологически безопасных препаратов с широким спектром действия для применения в растениеводстве.

Актуальность избранной темы.

Актуальность избранной диссертантом темы не вызывает сомнений. Почвенные актиномицеты рассматривают как одну из наиболее перспективных, но недостаточно изученных групп бактерий – plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), способных положительно влиять на продуктивность сельскохозяйственных растений, как за счет биологического контроля фитопатогенов и вредителей, так и благодаря фиторегуляторным свойствам и индукции системной устойчивости. Изучение метаболического потенциала широкого круга представителей актинобиоты открывает возможность их практического использования для создания биологических пестицидов, в качестве альтернативы химическим препаратам с их негативными последствиями для состояния окружающей среды и здоровья человека. Особый интерес представляют актиномицеты экстремальных местообитаний, к числу которых принадлежат почвы аридной зоны Северного Прикаспия. Для этого региона характерны сильнейшие засухи и засоление почв. Сочетание экстремальных факторов обуславливает высокую приспособленность микроорганизмов к среде обитания, что является основой их богатого биотехнологического потенциала.

В настоящее время сложилось известное противоречие между очевидными преимуществами актиномицетов в качестве агентов биологических препаратов и тем ограниченным количеством коммерческих продуктов на их основе, которые сегодня используются в растениеводческой практике. Это дает основание утверждать, что научная проблема, сформулированная в диссертации, а именно – поиск новых штаммов актиномицетов с комплексом агрономически ценных свойств является актуальной.

Основное содержание работы.

Диссертация состоит из Введения с обоснованием темы, описания объектов и методов исследования, главы, содержащей экспериментальные результаты, выводов и предложений по использованию результатов, списка литературы, включающего 397 источников, из них 181 – англоязычных. Большинство цитируемых работ выполнено в течение двух последних десятилетий. Диссертация изложена на 184 страницах, содержит 31 таблицу, 34 рисунка и 9 приложений.

По материалам диссертации опубликовано 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК, из них 4 статьи – в журналах, соответствующих научной специальности 1.5.11. – микробиология, по которой представлена к защите диссертационная работа. Ключевые

результаты исследований апробированы в докладах на международных и всероссийских конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

Работа опирается на хорошее знание автором предшествующей экспериментальной разработки проблемы отечественными и зарубежными учеными.

Для решения поставленных задач в исследованиях использованы адекватные методические подходы, отвечающие современным требованиям, и позволившие автору получить характеризующиеся новизной и значимостью научные результаты.

Научная новизна работы. Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Впервые для региона проведения исследований из почв с различной степенью засоления получен 21 природный изолят актиномицетов и среди них выявлены 3 штамма с полифункциональным действием (противовирусным, антифунгальным, антиоксидантным и фитостимулирующим). На основе результатов секвенирования фрагмента гена 16S рРНК определено филогенетическое положение выделенных культур. Произведена оценка экологической безопасности природных изолятов. Штаммы депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (RCAM), о чем к работе приложены соответствующие справки ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (г. Пушкин). На использование одного из изученных штаммов (*Streptomyces carpaticus* RCAM04697) для защиты от болезней и вредителей и стимуляции роста томатов получен коллективный патент РФ. Получено также свидетельство РФ на Базу данных «Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия».

С помощью комплекса аналитических методов (качественных реакций и тонкослойной (ТСХ), газовой (ГХ), высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии и масс-спектрометрии (МС)) в работе определен компонентный состав вторичных метаболитов новых штаммов актиномицетов, включая противомикробные соединения. Полученные результаты расширяют ранее имевшиеся представления о механизмах выживания и конкурентоспособности актиномицетов в условиях микробно-растительных консорциумов, а также их влияния на растения и могут быть использованы для разработки новых биопрепаратов на основе мицелиальных прокариот. Предложена технологическая схема и подобран ряд биотехнологических параметров для получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе новых штаммов актиномицетов. Эффективность применения экспериментальных образцов биопрепаратов в качестве стимуляторов роста и средств защиты растений картофеля и томата подтверждена результатами полевых производственных испытаний, выполненных на базе филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области.

Неоспоримым достоинством работы Л.Н. Григорян является четко выраженная практическая ориентированность проводимых исследований в сочетании с глубокой проработкой теоретических вопросов и стремлением раскрыть физиологические и биохимические механизмы, лежащие в основе эффективного действия разработанных ею экспериментальных образцов биопрепаратов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность полученных результатов.

Представленная Л.Н. Григорян работа характеризуется системностью и комплексностью подхода, исследование выполнено в соответствии с современными методологическими требованиями, что позволяет считать выдвигаемые к защите положения обоснованными. Результаты получены с использованием современных инструментальных методов (ПЦР, иммунохроматография, ГХ, ВЭЖХ, МС), в достаточном, для решения поставленных задач, количестве биологических и аналитических повторений, подвергнуты статистической обработке, ввиду чего в достоверности представленных автором сведений сомнений не возникает. Основные выводы и практические рекомендации подтверждены достаточным объемом экспериментальных исследований и соответствуют поставленным задачам.

Замечаний принципиального характера при анализе диссертационной работы не возникло. Следует, однако, отметить некоторые недочеты и задать ряд уточняющих вопросов.

В обзоре литературы неверно указано систематическое положение актиномицетов, таксономический ранг которых автор трактует на уровне рода (стр. 16).

Не ясно, каким образом автор изучала характер поверхности спор (стр. 39): об электронной микроскопии в работе не упоминается (стр. 38).

Имеет место явное противоречие между указанной фазой роста актиномицетных культур в момент взятия проб для анализа состава вторичных метаболитов – лаг-фаза – и соответствующей ей концентрацией бактерий – 10^9 КОЕ/мл (стр. 37). Высокий концентрационный показатель указывает на то, что период адаптации культурой к этому моменту уже пройден. Лаг-фаза длится от инокуляции до достижения максимальной скорости деления клеток (С. 195: Шлегель, 1987). Жаль, что в работе не определена динамика концентрации бактерий и/или константа скорости деления на протяжении всего периода роста культуры. Это позволило бы автору более взвешенно подойти к интерпретации фаз роста исследуемых штаммов.

Вызывает сомнение применимость метода определения концентрации клеток актиномицетов по измерению оптической плотности суспензии (стр. 51), представленной не однотипными по морфологии клетками, а различными по длине фрагментами мицелия. Получаемые в отношении нитевидных клеток данные могут не подчиняться закону Ламберта-Бэра (С. 479: Герхард, 1983. Т.1).

Если в контроле 1 не проводили опрыскивание или пролив растений (стр. 55), наблюдаемые в опытных вариантах эффекты могут быть обусловлены дополнительным увлажнением, а не биологическим действием биопрепаратов (стр. 122).

Метаболиты, выявленные при изучении водно-спиртовых экстрактов актиномицетов методом ВЭЖХ, представляют собой органические кислоты (молочная, лимонная, уксусная, фумаровая, яблочная и др.), образующиеся в качестве промежуточных или конечных продуктов цикла Кребса, гликолиза и других путей метаболизма многих бактерий. Обнаружение органических кислот в экстрактах клеток вполне предсказуемо и нет оснований считать именно их причиной бактерицидных или противовирусных свойств исследуемых штаммов (стр. 98, 129).

Не вполне безупречно в полевых испытаниях на культуре томатов сравнение экспериментальных биопрепаратов по противовирусному, фунгицидному и фитостимулирующему действию с инсектицидным препаратом Лепидоцид СК, взятым автором в качестве эталона (стр. 110-115). Нельзя считать удачным также выбор для демонстрации эф-

фективности действия биопрепаратов таких показателей, как «длина стебля, количество побегов, количество бутонов и цветков» (стр. 113). Томат относится к тем культурам, у которых пышное развитие вегетативной массы происходит в ущерб формированию хозяйственно ценной части продукции. Увеличение высоты стебля детерминантных (низкорослых) сортов, к которым относится Ажур F1, вряд ли можно рассматривать как желательный эффект. Обильное цветение также не означает, что будет высокий урожай плодов. Тем более странно выглядит измерение массы растения после завершения его вегетации. Большую ценность имела бы информация о сроках закладки, количестве цветочных кистей, количестве и размерах сформированных плодов, а не о количестве побегов, которые, согласно агротехнике томата, подлежат удалению в процессе формирования куста (пасынкования).

Содержащиеся в выводах 4 и 5 утверждения о противовирусных, антибактериальных и противоопухолевых свойствах метаболитов и соединений, обнаруженных в экстрактах исследованных штаммов с помощью различных аналитических методов, не имеют в данной работе экспериментального подтверждения. Выделение, очистка и изучение физиологического действия перечисленных индивидуальных веществ самим автором не проводились ни по отдельности, ни в сочетаниях (вывод 6).

Ряд замечаний касается оформления работы. Так, в структуре диссертации отсутствует, к сожалению, обобщающий раздел ЗАКЛЮЧЕНИЕ, который должен содержать авторскую оценку работы в целом. Описание природно-климатических условий Астраханской области помещено в главу РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ (стр. 57-58), на мой взгляд, неудачно. Описание материалов и методов сделано автором дважды: во Введении (стр. 9-10) и в главе 2 (стр. 37-38) практически дословно. В структуре автореферата отсутствует традиционный раздел «Объекты и методы».

Не лучший способ представления экспериментальных данных – многочисленные ссылки на разного уровня публикации автора (стр. 58, 60, 62-64, 67, 68, 70, 71, 87, 95, 99, 111, 115, 119, 126, 127 и т.д.), вместо их включения непосредственно в текст диссертации. При характеристике автором современного состояния изученности проблемы также неожиданным стало самоцитирование в разделе ВВЕДЕНИЕ (6 ссылок на стр. 6, 7).

Вызвала вопрос целесообразность размещения в главе РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ фото с общими планами проведения различных лабораторных манипуляций (рис. 12, 15-17, 19), более уместных в ПРИЛОЖЕНИИ.

Оставило желать лучшего качество фотоиллюстраций (рис. 3, 4, 6-9, 28, 30, 32, 33), которое затрудняет восприятие и объективную оценку представленной в них информации.

В ряде случаев на графиках не указаны названия и размерность осей (стр. 62, 113), отсутствует список использованных в работе сокращений.

Замечания носят рекомендательный характер и могут быть учтены автором в дальнейшей работе.

Заключение

Подробное рассмотрение указанных выше результатов исследований Л.Н. Григорян, а также опубликованных ею работ, приводит к заключению, что автором выполнен большой объем исследований, посвященных изучению биологической активности и компонентного состава метаболитов новых штаммов почвенных актиномицетов из подверженных экстремальным воздействиям местообитаний. Диссертация Л.Н. Григорян является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится практическое решение

задачи разработки и производства новых средств защиты растений, имеющей важное значение для развития сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии. Работа выполнена автором самостоятельно, содержит достаточное количество исходных данных, имеет пояснения, таблицы и рисунки. Основные научные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации и, как и диссертация, оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011. В публикациях Л.Н. Григорян с достаточной полнотой отражены результаты, приведенные в обсуждаемой работе.

Результаты и выводы настоящей диссертационной работы могут быть рекомендованы к использованию в практической деятельности организаций, непосредственно занимающихся вопросами разработки и производства биологических препаратов для защиты растений от фитопатогенов и вредителей и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Таким образом, диссертационная работа Л.Н. Григорян «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г. и № 1168 от 01.10.2018 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Григорян Лилит Норайровна - заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент,

доктор биологических наук 1.5.19 – почвоведение, 1.5.11 – микробиология,
зав. лабораторией биотехнологии растений и микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н.В. Рудницкого

Широких
Ирина Геннадьевна

Адрес: 610007, г. Киров, ул. Ленина, 166а.

Телефон: 8(8332)33-10-39

E-mail: irgenal@mail.ru

Собственноручную подпись И.Г. Широких заверяю.

Зам. директора ФГБНУ Федеральный
аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н.В. Рудницкого



Г.А. Баталова

20 августа 2021 г.